



RTD6401

Ver.740357

快速蛋白高灵敏度染色试剂盒

Fast and High Sensitivity Stain Kit for Proteins

产品编号及规格:

RTD6401 25次

产品组成:

货号	名称	规格	贮存
RTD6401-1	增敏液(100×)	26 ml	RT
RTD6401-2	染色溶液(100×)	26 ml	RT 避光
RTD6401-3	基本显色液(10×)	250 ml	4℃
RTD6401-4	显色加速液(2000×)	1.5 ml	RT 避光
RTD6401-5	终止液(20×)	125 ml	RT

储存、运输及效期:

按照标签温度贮存; 常温运输; 有效期一年。

产品简介:

快速蛋白高灵敏度试剂盒是一种快速简单、可用于SDS-PAGE或非变性PAGE等蛋白分离后染色的试剂盒。本试剂盒也可以用于2D凝胶的染色, 并且染色后兼容后续的质谱检测。本试剂盒只需约90分钟内可以完成凝胶的染色。对于BSA蛋白, 检测灵敏度下限可以达到0.3 ng。

本试剂盒可足够用于25块常规的8×10 cm凝胶的染色。

注意事项:

1. 由于该方法非常灵敏, 操作时请使用高纯度的水, 并确保所使用的器皿非常清洁, 最好使用洁净的玻璃器皿。操作时必须戴手套, 避免和凝胶直接接触。
2. 需自备乙醇、冰醋酸及MilliQ级纯水或双蒸水。
3. 下述使用说明中各种溶液的使用量适用于大小为8×10cm厚度为0.75-1mm的凝胶。对于更大的凝胶, 各种溶液的使用量需按凝胶面积的比例放大, 对于更厚的凝胶, 作用时间需适当延长。
4. 本说明书所指的常温温度为20-25℃, 操作温度较低时由于溶液的扩散能力下降, 各步骤需适当延长时间。

5. 基本显色液(10×)在低温环境下可能会出现沉淀, 可在30-37℃水浴中溶解, 并充分混匀后使用。

使用方法:

一、固定步骤:

- 1.1 电泳结束后, 取凝胶放入100 ml固定液中, 在摇床上常温摇动20 min, 摇动速度为60-70 rpm。
注: 固定40分钟以上甚至过夜可以进一步降低背景。

加入顺序	固定液配制量	100 ml
1	超纯水	40 ml
2	无水乙醇	50 ml
3	冰醋酸	10 ml

1.2 30%乙醇洗涤:

弃固定液, 加入100ml 30%乙醇, 在摇床上常温摇动10分钟, 摇动速度为60-70 rpm。

30%乙醇的配制:

70ml MilliQ级纯水或双蒸水中加入30ml乙醇, 混匀后即成100ml 30%乙醇。

1.3 水漂洗:

弃30%乙醇, 加入200ml MilliQ级纯水或双蒸水, 在摇床上室温摇动10分钟, 摇动速度为60-70 rpm。

二、增敏步骤:

2.1 弃水, 加入100 ml增敏液(1×), 在摇床上常温摇动2分钟, 摇动速度为60-70 rpm。

增敏液(1×)的配制:

99 ml MilliQ级纯水或双蒸水中加入1ml增敏液(100×), 混匀。增敏液(1×)配制后需在2小时内使用。

2.2 水漂洗(共2次):

弃原有溶液, 加入200ml MilliQ级纯水或双蒸水, 在摇床上常温摇动1分钟, 摇动速度为60-70 rpm。重复步骤2.2一次。

三、染色步骤:

3.1 弃水, 加入100 ml染色溶液(1×), 在摇床上常温摇动10分钟, 摇动速度为60-70 rpm。

染色溶液(1X)的配制:

99 ml 双蒸水中加入1 ml染色溶液(100X), 混匀后即成染色溶液(1X)。染色溶液(1X)配制后需在2小时内使用。

3.2 水洗涤:

弃原有溶液, 加入100 ml 双蒸水, 在摇床上常温摇动1-1.5分钟, 摇动速度为60-70 rpm。

注意: 水洗涤的时间不能超过1.5分钟。

四、显色步骤:

弃水, 加入100 ml显色液, 在摇床上常温摇动3-7分钟, 直至出现比较理想的预期蛋白条带, 摇动速度为60-70 rpm。

加入顺序	显色液配制量	100 ml
1	基本显色液(10×)	10 ml
2	超纯水	90 ml
3	显色加速液(2000×)	0.05 ml

注: 显色加速液(2000X)有刺激性气味, 建议在通风橱内操作; 银染显色液配制后需在20分钟内使用。

五. 终止步骤:

5.1 弃显色液, 加入100 ml终止液(1×), 在摇床上常温摇动10分钟, 摇动速度为60-70 rpm。终止时有气体产生属正常现象, 产生的气体为二氧化碳。

终止液(1×)的配制:

95 ml 双蒸水中加入5 ml终止液(20×), 混匀后即为止液(1×)。终止液(1×)配制后宜当天使用。

5.2 水洗涤:

弃终止液, 加入100 ml MilliQ级纯水或双蒸水, 在摇床上常温摇动5分钟, 摇动速度为60-70 rpm。

六. 保存:

可在MilliQ级纯水或双蒸水中保存或采用适当的方式制备成干胶。

1.3 凝胶中原有的缓冲液在固定步骤中没有去除干净。一方面需确保固定的时间和固定液的用量, 另一方面对于Bis-Tris系统的凝胶需要更长的固定时间以充分去除凝胶中的原有缓冲成分, 以降低背景。

1.4 水的纯度太低。需使用大于16 MΩ·cm的高纯度水。

二. 蛋白条带非常浅:

2.1 蛋白的半胱氨酸(Cysteine)残基的含量特别低或几乎没有。半胱氨酸残基的存在对于染色非常重要, 半胱氨酸残基的含量过低会导致检测灵敏度下降。

2.2 染色后水洗涤时间过长(步骤3.2)。在染色液染色后需严格控制水洗涤的时间, 水洗涤的时间不能超过1.5分钟, 否则会导致检测灵敏度下降。

2.3 上样量不足。本试剂盒检测BSA的灵敏度可以达到0.3 ng, 对于不同的蛋白检测灵敏度可能不同。对于一些蛋白可能需要大于1 ng的蛋白量才能被检测到。

2.4 固定步骤后的洗涤不够充分(步骤1.2和1.3)。导致少量乙酸残留, 影响后续检测。确保30%乙醇洗涤和水洗涤的用量和时间, 可以适当延长洗涤时间。

三. 凝胶上出现小点或其它非蛋白的痕迹:

3.1 凝胶没有充分被溶液浸没。请注意选择大小合适的容器, 并加入足量的各种溶液, 同时需保持适当的混匀速

度确保凝胶可以被溶液浸没。

3.2 用于染色的容器没有充分洗涤干净。容器需先用洗涤剂充分洗涤, 随后用自来水充分冲洗, 最后用高纯度水再洗涤数次。该容器最好能专用于染色, 并注意避免各种可能的蛋白污染。为确保充分洗涤干净, 对于耐硝酸的容器, 例如玻璃容器, 可以在上述洗涤剂及自来水洗涤后用50%硝酸洗涤, 随后用高纯度水充分洗涤。

3.3 指纹或其它压痕。请注意戴手套操作, 切勿裸手直接接触凝胶。操作时请注意尽量勿挤压、折叠或摩擦凝胶。

3.4 有金属物质接触凝胶。金属物质例如金属镊子等接触凝胶会出现非特异性痕迹。

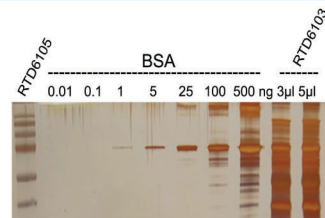
四. 在60-70 kD处出现一片模糊的蛋白染色背景:

皮肤上脱落的角蛋白(keratin)污染了蛋白样品。一方面需注意戴手套操作, 另一方面需注意盛放蛋白样品的容器盖子尽量不要敞开, 甚至在取放蛋白样品时在超净台内进行以避免可能的角蛋白污染。

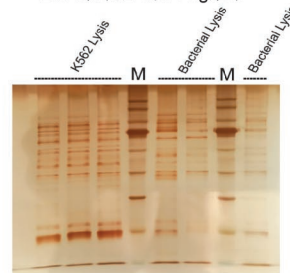
五. 在凝胶的顶端处出现黄色背景:

5.1 样品中DTT浓度很高。采用其它适当的还原试剂, 或者在许可范围内适当减少DTT的用量。

5.2 采用Tris-Glycine-SDS电泳体系。Tris-Glycine-SDS电泳体系中的Glycine会导致背景凝胶的顶端出现轻微黄色背景。



12% RealPAGE SDS-PAGE
1×TGS 200 V 50 min
BSA银染后可见1 ng条带



10% SDS-PAGE
1×TGS 200 V 55 min

常见问题**一. 背景太深:**

1.1 显色时间过长(步骤四)。通常显色反应会在10分钟内结束, 显色反应时间过长会导致背景很深。

1.2 洗涤不充分。洗涤时间过短, 或洗涤液加入的量不足, 或者容器过于狭小导致摇动时溶液不易充分混合, 或摇动速度过慢, 导致混匀不充分。请按照说明书的建议确保各种溶液的用量和作用时间, 摇床的推荐速度为60-70 rpm。